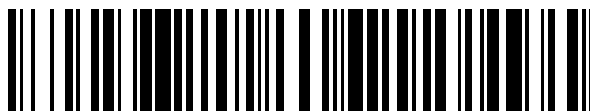


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 596**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/14 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2014** **PCT/IB2014/002252**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015** **WO15008160**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2014** **E 14799885 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018** **EP 3022290**

54 Título: **Cepa de algas modificada y método de acumulación de triacilglicerol utilizando dicha cepa**

30 Prioridad:

19.07.2013 US 201361856378 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (33.3%) y
FERMENTALG (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CALLEJA, PIERRE;
LETERRIER, MARINA y
MARECHAL, ERIC**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 663 596 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cepa de algas modificada y método de acumulación de triacilglicerol utilizando dicha cepa

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una cepa de algas modificada en la que la actividad de la proteína CGI-58, o uno de sus homólogos, ha sido modificada para permitir la acumulación de aceite, ventajosamente de triacilglicerol.

Más precisamente, en una de sus realizaciones preferidas, la expresión del gen CGI-58 se silencia o se atenúa. La presente invención se refiere además a un método de acumulación de triacilglicerol usando dicha cepa modificada.

Antecedentes

10 Las diatomeas son un importante filo de la biodiversidad del fitoplancton en los océanos, el agua dulce y en diversos hábitats del suelo. Son responsables de hasta el 25% de la productividad primaria global. El estudio de este grupo de eucariotas se ha beneficiado de los desarrollos recientes en dos especies, *Phaeodactylum tricornutum*, un modelo de diatomeas pennadas y *Thalassiosira pseudonana*, un modelo de diatomeas marinas céntricas, para el cual se han realizado intensos esfuerzos para secuenciar sus genomas, definir datos de referencia para estudios de transcriptoma y proteoma de células enteras y, eventualmente, desarrollar herramientas moleculares para acelerar los análisis funcionales. Por lo tanto, las herramientas moleculares permiten descifrar el papel de las proteínas mediante tecnologías de eliminación de genes (RNAi) y la caracterización funcional de las líneas genéticamente modificadas obtenidas. La disponibilidad de modelos para diatomeas tanto pennadas como céntricas también es esencial para abordar características comunes o específicas de estos dos grupos.

20 Las diatomeas, como otras microalgas, se consideran una fuente alternativa plausible de hidrocarburos para reemplazar los combustibles fósiles, con la ventaja de tener un balance neutral de CO₂, basado en la hipótesis de que el CO₂ y el agua pueden convertirse eficientemente en biomasa por fotosíntesis y que el metabolismo del carbono podría controlarse para que acumulasen el energéticamente rico triacilglicerol (TAG, también llamado aceite). Se ha centrado la atención en diferentes organismos fitoplanctónicos del superfilo Chromalevolata por su capacidad para acumular TAG, con rendimientos iniciales prometedores y una robustez y propiedades físicas adecuadas para ser implementadas en procesos industriales, incluyendo *P. tricornutum*. El *P. tricornutum* se utiliza actualmente para la producción industrial de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, pero la implementación industrial de biocombustibles aún está limitada por el retraso del crecimiento y el bajo rendimiento en biomasa cuando la acumulación de TAG se desencadena utilizando métodos convencionales de inanición de nutrientes, tal como la inanición de nitrógeno. *P. tricornutum* exhibe propiedades interesantes para una implementación industrial, como la capacidad de crecer en ausencia de silicio o la sedimentación de las células que podría ser útil para las técnicas de cosecha. Por lo tanto, se necesitan avances en ingeniería genética y rendimientos agrícolas para aplicaciones de biocombustibles. Los intentos de promover la acumulación de TAG pueden basarse en diversas estrategias que pueden combinarse, incluida la estimulación de la biosíntesis de ácidos grasos y TAG, el bloqueo de vías que desvían el carbono hacia rutas metabólicas alternativas y, finalmente, la detención del catabolismo de TAG.

35 Muchas proteínas se asocian a gotitas de aceite y controlan el almacenamiento o la liberación del TAG utilizado para la energía, la biogénesis de la membrana o la señalización. CGI-58 (identificación de genes comparativo 58), una proteína del tipo α/β hidrolasa principalmente, es una de estas proteínas de gotas de lípidos implicadas en la hidrólisis del TAG en mamíferos. En ratones, la reducción de CGI-58 indujo un aumento de 4 veces en las células hepáticas. Existe un homólogo CGI-58 en las angiospermas y su eliminación en *Arabidopsis* condujo a la acumulación de gotitas de aceite en los tejidos foliares, que normalmente no almacenan lípidos. En los mamíferos, la actividad de CGI-58 está regulada por una proteína llamada perilipina. No se han identificado homólogos de esta proteína en las angiospermas. En *Arabidopsis*, se demostró que CGI-58 interactúa con PXA1, un transportador de ácidos grasos en la superficie de los peroxisomas, alimentando la ruta catabólica de la β -oxidación peroxisomal. Por lo tanto, CGI-58 aparece como una proteína localizada en la superficie de las gotas de aceite e interactuando con varias proteínas asociadas de animales a plantas, involucradas en el catabolismo de TAG. La acción de CGI-58 ocurre, por lo tanto, por diferentes mecanismos en diferentes organismos, con parejas proteicas distintas que siguen a la especie (por ejemplo, perilipina en mamíferos o PXA1 en angiospermas). No se han demostrado las posibles proteínas asociadas en diatomeas.

Descripción

50 La presente invención se refiere a una cepa de una especie perteneciente al reino Chromalveolata en la que se ha modificado la actividad de la proteína CGI-58 para permitir la acumulación de aceite, ventajosamente de triacilglicerol, en el que la cepa es una cepa genéticamente modificada en la que la expresión del gen CGI-58 se silencia o se atenúa.

Preferiblemente, el organismo protista o la cepa protista pertenece al reino Chromalveolata.

55 La expresión del gen CGI-58 se atenúa o se silencia (por ejemplo, eliminándola).

Si el gen se silencia, no hay expresión génica ni síntesis de proteína CGI-58.

Si el gen se atenúa, la expresión del gen y la síntesis de la proteína CGI-58 disminuyen al menos al 50%, preferiblemente al menos al 70% y más preferiblemente al menos al 90%.

5 Más preferiblemente, la cepa modificada es, respectivamente, una cepa de diatomeas o una diatomea, aún más preferiblemente una diatomea pennada o una cepa de diatomea pennada.

Ventajosamente, la diatomea pennada o la cepa de diatomea pennada es del género *Phaeodactylum* y, más preferiblemente, de la cepa *Phaeodactylum tricornutum*.

10 Un ejemplo de la cepa *Phaeodactylum tricornutum* es la cepa *Phaeodactylum tricornutum* (Pt1) Bohlin 8.6 CCMP2561 (Colección de Cultivo de Fitoplancton Marino, ahora conocida como NCMA: Centro Nacional de Algas Marinas y Microbiota).

La cepa modificada de acuerdo con la invención puede acumular o contener al menos 1,5 veces, preferiblemente 4 veces, el contenido de triacilglicerol de la cepa de tipo silvestre correspondiente.

15 Por "cepa de tipo silvestre correspondiente", se entiende la cepa, antes de la modificación que apunta a silenciar o atenuar la actividad de la proteína CGI-58, preferiblemente la expresión del gen CGI-58 (es decir, el organismo o la cepa no transformada).

De hecho, los inventores han demostrado que los protistas que albergan la construcción de silenciamiento contienen más aceite (> que 1,5 veces el aumento). En particular, la invención permite alcanzar un aumento de 4 veces. Además, también han demostrado que:

20 - Los protistas que albergan la construcción silenciadora contienen más aceite en medio de cultivo (tal como ESAW) que contiene nitrógeno (también llamado "medio enriquecido en nitrógeno", tal como nitrato de sodio, NaNO_3 0,05 g/L o 0,034 g/L de elemento N) o sin nitrógeno (sin adición) que las células no transformadas de tipo silvestre;

- Los protistas que albergan la construcción de silenciamiento contienen más aceite que las células no transformadas de tipo silvestre;

25 - Los protistas que albergan la construcción de silenciamiento acumulan petróleo antes que las células no transformadas de tipo silvestre;

- La acumulación de aceite ocurre en la fase logarítmica temprana de crecimiento;

- La acumulación de aceite no se correlaciona con un retraso del crecimiento.

30 La presente invención describe además un método de preparación de un organismo modificado genéticamente o cepa según la invención, que comprende la transformación de un organismo con un vector que expresa la construcción de ARNi diseñada para dirigir la expresión del gen CGI-58.

Ventajosamente, el vector se introduce en el organismo por métodos biolísticos (bombardeo de partículas) o electroporación.

Después de la transformación, se seleccionan y cultivan organismos en los que la expresión del gen CGI-58 o cualquier gen homólogo del mismo se atenúa o silencia.

35 La presente invención describe además un método de acumulación de triacilglicerol en un organismo que pertenece al reino Chromalveolata, que comprende la etapa de silenciar la expresión de CGI-58 en dicho organismo.

Ventajosamente, en dicho método de acumulación, el organismo se cultiva en un medio que contiene nitrógeno o alternativamente en un medio empobrecido en nitrógeno.

40 Después de 1 día (preferiblemente 3 días) en el medio de cultivo, se recogen los organismos genéticamente modificados y se recuperan los triacilglicerol(es).

La invención abarca además el uso de un organismo modificado genéticamente o una cepa según la invención para la producción de triacilglicerol(es).

Más detalles y especificidades de la invención aparecerán en los siguientes ejemplos y figuras.

45 La Figura 1 describe la estrategia de silenciamiento de CGI-58 de *Phaeodactylum tricornutum* utilizada en la invención. La Figura 1A muestra una representación esquemática de la construcción hla-CGI-58 utilizada para la transformación. La Figura 1B muestra la secuencia completa del vector que alberga la secuencia antisentido de CGI-58.

La Figura 2 describe una representación esquemática de la validación de la reacción en cadena de la polimerasa de la transformación genética de *Phaeodactylum*. Las flechas representan los cebadores de PCR utilizados en el experimento. Los fragmentos amplificados (1800 pb y 700 pb) solo se observan en células transformadas, no en células no transformadas.

5 pH4: promotor H4;

AS: fragmento antisentido correspondiente a CGI-58;

Ter: secuencia del terminador.

10 La Figura 3 describe el cribado de *Phaeodactylum tricornutum* transformado con el constructo antisentido CGI-58 basado en la intensidad de fluorescencia específica del Rojo Nilo 1_1, 1_10: líneas expresantes antisentido CGI-58 obtenidas según la invención después de la transformación de la cepa silvestre de *P. tricornutum* con el vector de expresión antisentido CGI- 58 obtenido de acuerdo con la "construcción genética para el silenciamiento de CGI-58".

WT: *P. tricornutum* tipo silvestre.

(+N): medio de cultivo rico en nitrógeno

(-N): medio de cultivo sin nitrógeno.

15 Figura 4: Crecimiento y acumulación de cuerpos oleosos en *Phaeodactylum tricornutum* transformado con la construcción antisentido CGI-58.

Figura 4A. Curva de crecimiento y acumulación de aceite a lo largo del tiempo. El aceite se determinó durante el crecimiento. Los resultados obtenidos para *P. tricornutum* que contienen antisentido de CGI-58 son (-■-) en comparación con los obtenidos con el tipo silvestre de *P. tricornutum* (WT) (-♦-).

20 Figura 4B. Observación mediante microscopía de la acumulación de aceite con la sonda de Rojo Nilo.

Ejemplo 1: Transformación de *P. tricornutum* silenciando la expresión genética de CGI-58 y la acumulación de aceite

1. Materiales y métodos

25 Cepa de *Phaeodactylum tricornutum* y condiciones de crecimiento. La cepa de *Phaeodactylum tricornutum* (Pt1) Bohlin 8.6 CCMP2561 (Colección de Cultivo de Fitoplancton Marino, ahora conocido como NCMA: Centro Nacional de Algas Marinas y Microbiota) se usó en todos los experimentos (Berges JA et al., 2001, J Phycol 37: 1138- 1145). Pt1 se cultivó a 20°C en un matraz de 250 mL usando medio de agua marina enriquecida (ESAW). Las células se cultivaron en un ciclo de luz 12:12 (450 $\mu\text{E}^{-1}\text{s}^{-1}$)/oscuridad. Las células se subcultivaron cada semana inoculando medio fresco con 1/5 de cultivo previo. El medio pobre en nitrógeno N(-) no contenía ninguna fuente de nitrógeno. El medio repleto de nitrógeno N(+) contenía 0,05 g/L de NaNO_3 .

30 Construcción genética para el silenciamiento de CGI-58.

35 El ADN genómico se extrajo de la cepa Pt1 de *Phaeodactylum tricornutum* usando el siguiente procedimiento: 100 mg de células de Pt frescas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 400 μL de tampón de extracción (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM); SDS 0,5%, p/v). Después de una centrifugación de 5 minutos a 10.000 x g, el sobrenadante se transfirió al mismo volumen de isopropanol para precipitar el ADN. Después de una centrifugación adicional de 15 minutos a 10.000 x g, el sedimento se lavó con etanol al 70%, se secó y se solubilizó en agua. La concentración de ADN se midió usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), y la calidad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Utilizando ADN genómico como matriz, se amplificó una secuencia de 436-pb por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes cebadores diseñados a partir de XM_002183547 (homólogo de Pt CGI.58) y llevando 40 respectivamente los sitios de restricción EcoRI y XbaI (secuencia subrayada): Pt. CGI-58. AS.F TCGAATTCTTGCAGGGTCGTCTGATGTA. Pt.CGI-58.AS.R CTAGATCTAGATGGCCCGACTTACTCACT. La PCR se realizó con un termociclador S1000™ (Bio-rad laboratory inc.) utilizando la polimerasa Phusion High Fidelity (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR fue digerido por EcoR I y Xba I, purificado y clonado en el vector de expresión linealizado.

45 El vector de expresión utilizado para silenciar se generó a partir del vector antisentido hla (nombre en la publicación princeps de De Riso y colaborador: "h" significa promotor H4, "l" para "fragmento largo de este promotor" y "a" para antisentido desarrollado previamente (De Riso V et al, 2009, Nucleic Acids Res 37: e96), y que alberga una secuencia informadora de β -glucuronidasa (GUS).

50 El fragmento GUS 250 pb se escindió de hla con EcoR I y Xba I. La mezcla de ligación del vector hla escindido lineal y el fragmento antisentido CGI-38 de 436 pb se transformó luego en DH5 α *Escherichia coli*. Las colonias positivas se identificaron mediante PCR, y los productos se secuenciaron posteriormente.

Primer método de transformación: transformación biolística

Los vectores se introdujeron en *P. tricornutum* mediante bombardeo de micropartículas utilizando un sistema de suministro de partículas Biolistic PDS-1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), como se ha descrito previamente (Falcatore A et al., 1999, Mar Biotechnol (NY) 1: 239-251), equipado con discos de ruptura de 1.550 psi. Partículas de tungsteno (M-17) se recubrieron con 1 µg de ADN plasmídico, previamente linealizado por Pvu II, en presencia de CaCl₂ y espermidina. Una hora antes del bombardeo, aproximadamente 5x10⁷ células se extendieron en el centro de una placa que contenía 20 ml de medio de cultivo sólido (medio ESAW, agar 1%). Las placas se colocaron en el segundo nivel dentro de la cámara biolística para el bombardeo. Las células bombardeadas se dejaron recuperar durante 48 h antes de suspenderse en 1 ml de medio ESAW. 500 µl de esta suspensión se pusieron en placas en un medio sólido que contenía zeocina a 75 µg/ml. Después de dos a cuatro semanas de incubación en luz blanca (175 µmol m⁻².s⁻¹; fotoperíodo de 12 h) a 20°C, se recogieron colonias resistentes individuales y se sembraron en placas de agar ESAW frescas suplementadas con zeocina a 75 µg/ml y se inocularon en medio líquido ESAW para análisis adicionales. La presencia del transgen en *Phaeodactylum tricornutum* finalmente se validó mediante amplificación por PCR usando ADN genómico de colonias resistentes.

Segundo método de transformación: electroporación

Los vectores se introdujeron en *P. tricornutum* por electroporación con múltiples pulsos, siguiendo el método descrito por Miyahara et al (2013) Biosci. Biotechnol. Biochem, 77: 120936-1-3. Se pueden usar otros métodos de electroporación con múltiples pulsos.

Tinción con Rojo Nilo de gotas de aceite

La acumulación de gotitas de aceite se controló mediante tinción fluorescente con Rojo Nilo (Sigma Aldrich) (longitud de onda de excitación a 485 nm, emisión a 525 nm) como se ha descrito previamente (Cooksey KE et al., 1987, J. Microbiol. Meth. 6:333-345). En resumen, las células se diluyeron y se ajustaron a una densidad celular que se correlacionó linealmente con la fluorescencia del Rojo Nilo. Se añadió solución de Rojo Nilo (40 µl de una concentración madre de 2,5 µg/ml, en 100% de DMSO) a 160 µl de suspensión celular. La fluorescencia específica se determinó dividiendo la intensidad de fluorescencia del Rojo Nilo por el número de células. Los cuerpos oleosos teñidos con Rojo Nilo se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss AxioScope.A1 (filtro FITC; longitud de onda de excitación a 488 nm; emisión a 519 nm).

Extracción con triacilglicerol (TAG), separación mediante cromatografía en capa fina, cuantificación y análisis. Se extrajeron triacilglicerol de 200 mg de células de *Phaeodactylum tricornutum* liofilizadas, de acuerdo con Domergue F et al., 2003, Plant Physiol 131: 1648-1660, para evitar la degradación de los lípidos. Brevemente, las células se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de la cosecha. El sedimento celular liofilizado se resuspendió en 4 ml de etanol hirviendo durante 5 minutos seguido de la adición de 2 ml de metanol y 8 ml de cloroformo a temperatura ambiente. La mezcla se saturó luego con argón y se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. Después de la filtración a través de lana de vidrio, los restos celulares se enjuagaron con 3 ml de cloroformo/metanol 2:1, v/v. Para iniciar la formación de la bifase, se añadieron entonces 5 ml de NaCl al 1% al filtrado. La fase clorofórmica se secó en atmósfera de argón antes de volver a solubilizar el extracto lipídico en cloroformo puro. Para aislar TAG, los lípidos se corrieron en placas de cromatografía en capa fina de gel de sílice (TLC) (Merck) con hexano:diétiléter:ácido acético (70:30:1, v/v). Los lípidos se visualizaron luego bajo luz UV después de la pulverización del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico al 2% en metanol. Luego se rasparon de las placas de TLC para análisis adicionales. Para el perfil de acilo y la cuantificación de TAG, los ácidos grasos se metilaron utilizando 3 ml de H₂SO₄ al 2,5% en metanol durante 1 hora a 100°C (incluidas las cantidades estándar de 21:0). La reacción se detuvo mediante la adición de 3 ml de agua y 3 ml de hexano. La fase de hexano se analizó mediante cromatografía líquida de gas (Perkin Elmer) en una columna BPX70 (SGE). Los ácidos grasos metilados se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares y se cuantificaron mediante el método del pico de superficie usando 21:0 para la calibración. La extracción y la cuantificación se realizaron al menos 3 veces.

2. Resultados

Generación de *Phaeodactylum tricornutum* que expresa una construcción antisentido CGI-38.

Solo un gen único que codifica un homólogo de CGI-58 (genbank XM_002183547; Phatrdraft 54974) se predijo en el genoma de *P. thicornutum* mediante búsqueda de similitud convencional de BlastP (Altschul SF et al., 1990, Journal of Molecular Biology 215: 403-410). Para dirigir el silenciamiento de Phatrdraft 54974, se construyó un vector cuya expresión estaba bajo el control del promotor H4 (De Riso V et al, 2009, Nucleic Acids Res 37:e96). El vector de expresión utilizado para silenciar se generó a partir del vector antisentido hla (nombre en la publicación princeps de De Riso y colaborador: "h" significa el promotor H4, "l" para "fragmento largo de este promotor" y "a" para antisentido desarrollado previamente (De Riso V et al, 2009, Nucleic Acids Res 37:e96). Este vector hla se ha modificado para eliminar el fragmento antisentido que inicialmente contenía correspondiente a un fragmento GUS, e introduce un fragmento antisentido correspondiente a CGI-58. La región objetivo para el silenciamiento correspondió a la porción final de la secuencia Phatrdraft 54974/CGI-58 (Figura 1).

Después de la transformación de *Phaeodactylum* usando una pistola de partículas o electroporación, las células transformadas se seleccionaron bajo presión de selección de zeocina y se seleccionaron clones putativos silenciados. La reducción del gen CGI-58 endógeno se controló entonces mediante RT-PCR cuantitativa usando cebadores correspondientes a una transcripción de longitud completa.

- 5 En ausencia de anticuerpos específicos, no se pudo evaluar el nivel real de CGI-58. Sin embargo, un simple ensayo basado en células permite el análisis funcional de CGI-58 en el catabolismo de los cuerpos oleosos. Por lo tanto, las células transformadas se cribaron usando un ensayo de Rojo Nilo, que monitoriza directamente la acumulación de aceite dentro de las células en medio rico en nitrógeno (+N) o sin nitrógeno (-N) (Figura 3). Se observa una mayor cantidad de tinción de Rojo Nilo en comparación con los niveles de tipo silvestre (Figura 3). De manera muy notable, el mayor nivel de aceite que se acumula en las líneas de expresión antisentido de CGI-58, tal como en la línea 1_10, se observó en condiciones tanto ricas en nitrógeno como carentes de nitrógeno.

- 10 Después de la transformación de *P. tricornutum* con la construcción antisentido de CGI-58, las células se cultivaron durante 5 días, y luego se subcultivaron nuevamente en un medio que contenía nitrógeno o que carecía de este nutriente. Las células se analizaron después de 2 días de crecimiento en medio ESAW, con o sin nitrógeno. La fluorescencia del Rojo Nilo (NR) se midió usando un fluorímetro, y se expresó por 10^6 células. El vector inicial que expresa un antisentido GUS (hla) se usó como control vectorial y no mostró diferencias con WT. WT, células de tipo silvestre no transformadas.

- 15 Se comparó el crecimiento de las células transformadas y las no transformadas, monitorizadas en paralelo en medio ESAW. Como se muestra en la Figura 4A, el crecimiento no muestra retraso y es comparable entre células transformadas y no transformadas.

- 20 Luego se analizó el fenotipo de las células y las gotas de aceite en las células transformadas y no transformadas. Como se muestra en la Figura 4B, las gotas de aceite aparecen temprano durante el crecimiento, con la formación de múltiples gotas que parecen converger para formar dos gotas grandes a cada lado del núcleo.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CALLEJA Pierre LETERRIER Marina MARECHAL Eric	
5	<120> Cepa de algas modificada y método de acumulación de triacilglicerol utilizando dicha cepa	
	<130> B130274 QTA	
10	<150> PCT/US61/856378 <151> 19-07-2013	
	<160> 3	
15	<170> BiSSAP 1.3	
	<210> 1 <211> 28 <212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador PCR	
25	<400> 1 tcgaattctt gcagggtcgt ctgatgta	28
	<210> 2 <211> 29 <212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Cebador PCR	
35	<400> 2 ctagatctag atggcccgcac ttactcact	29
	<210> 3 <211> 4611 <212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Secuencia completa del vector que contiene la secuencia antisentido CGI-58	
45	<400> 3 ctaaattgta agcgttaata ttttggttaa attcgcgtta aatttttggt aaatcagctc	60
	attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga	120
	gataggggtg agtgttggtc cagtttgtaa caagagtcca ctattaaaga acgtggactc	180
	caacgtcaaa gggcgaaaaa ccgtctatca gggcgatggc cactacgtg aaccatcacc	240
	ctaatacaagt tttttggggt cgaggtgccg taaagcacta aatcggaacc ctaaaggagg	300
	ccccgattt agagcttgac ggggaaagcc ggcgaacgtg gcgagaaagg aagggaagaa	360
	agcgaagga ggcggcgcta gggcgctggc aagtgtagcg gtcacgctgc gcgtaaccac	420
	cacacccgcc gcgcttaatg cgccgctaca gggcgcgctc cattcgccat tcaggctgcg	480

ES 2 663 596 T3

caactgttgg	gaagggcgat	cgggtgcgggc	ctcttcgcta	ttacgcccagc	tggcgaaagg	540
gggatgtgct	gcaagggcgat	taagttgggt	aacgccaggg	ttttcccagt	cacgacgttg	600
taaaacgacg	gccagtgagc	gcgcgtaata	cgactcacta	tagggcgaaat	tgagagctcgc	660
aatctcacgc	accagggcgt	ggaagggcaa	cttgcggatg	agaaggtccg	tgactttctg	720
gtaacgacgg	atctcacgca	gagcgacggt	tccagggcga	taacggtggg	gcttcttgac	780
tcctccggta	gccggagcgg	acttgcgggc	agccttggtg	gcaagctgct	tgcgcggcgc	840
tttgccctcg	gtggatttac	gggcggtttg	cttggttcgg	gccattttga	cggttttttt	900
tacaagagaa	gagttcttga	aattttgtgag	gttaaagtgt	gtggcttccg	ccgtagtcaa	960
ggagcgtgcg	gttgccgac	gcaccggtac	gttctgtaga	aatgaacaca	gtgtgttgaa	1020
ttgaaagtat	ggcgaggtta	tggtgtgtga	taagtagcag	ccgcgccgag	acaacaaac	1080
tttggtttct	acgacaatct	ctgtagacaa	gtactagaaa	cccgtttgaa	cgagcataaa	1140
tctgcaccgg	caggccacca	gacatcgttt	caacgtaata	ttctacgtaa	ccattttatc	1200
ccaggaaacc	tacggcctgt	gaaccaccga	gacggagcac	tcacaattcg	ctctcggcaa	1260
caaccgacaa	tcgtcttact	cacagtcaat	accgaaaaca	aacaacagcc	atggccaagt	1320
tgaccagtgc	cgttccgggt	ctcaccgcgc	gcgacgtcgc	cggagcggtc	gagttcttga	1380
ccgaccggct	cgggttctcc	cgggacttcg	tgaggagcga	cttcgccggt	gtggtccggg	1440
acgacgtgac	cctgttcac	agcgcggtcc	aggaccaggt	ggtgccggac	aacaccctgg	1500
cctgggtgtg	ggtgcgcggc	ctggacgagc	tgtacgccga	gtggctcgag	gtcgtgtcca	1560
cgaacttccg	ggacgcctcc	gggccggcca	tgaccgagat	cggcgagcag	ccgtgggggc	1620
gggagttcgc	cctgcgcgac	ccggccggca	actgcgtgca	cttcgtggcc	gaggagcagg	1680
actgaccgac	gccgaccaac	accgccggtc	cgacgcggcc	cgacgggtcc	gaggccttct	1740
agatggcccc	acttactcac	ttgatataca	tcaactcggg	gtgcatcttg	attcattgac	1800
cgttttagctt	ctgctgcttg	ctggacctgc	aatccaccat	ttgaatccat	ccaatcttga	1860
gcaccgtaca	aaaagcctac	cgaaggaacc	ttcaaattgg	gaatccgatg	caaggctggc	1920
tcctttgcaa	aaataccagg	cgtcaagata	cgattaatgc	agtactctcc	ggatgcgggc	1980
aaggtagcgg	cgcttcgata	gaggtattcc	gataccgcga	cacgctcctt	ctcatcatca	2040
atcgccggta	atcgacgacg	tacgtattcc	tgaatcatcc	gctcgctacg	actagtgggt	2100
aacatgcgca	gcacgtctcc	gggagtttgc	cgcccgaaaca	ggtagttgaa	tgttccgtac	2160
atcagacgac	cctgcaagaa	ttctgagcta	cctcgacttt	ggctgggaca	ctttcagtga	2220
ggacaagaag	cttcagaagc	gtgctatcga	actcaaccag	ggacgtgcgg	cacaaatggg	2280
catccttgct	ctcatggtgc	acgaacagtt	gggagtctct	atccttcctt	aaaaatttaa	2340
ttttcattag	ttgcagtcac	tccgcttttg	tttcacagtc	aggaataaca	ctagctcgtc	2400
ttcaggtagc	cagcttttgt	tccctttagt	gagggttaat	tgcgcgcttg	gcgtaatcat	2460
ggtcatagct	gtttcctgtg	tgaaattggt	atccgctcac	aattccacac	aacatacgag	2520

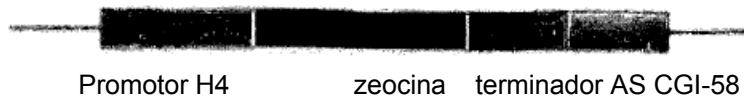
ES 2 663 596 T3

ccggaagcat aaagtgtaaa gcctggggtg cctaattgagt gagctaaactc acattaattg	2580
cgttgcgctc actgcccgtt ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa	2640
tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag ctcttcgctc tcctcgctca	2700
ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggg atcagctcac tcaaaggcgg	2760
taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc	2820
agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc	2880
cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac	2940
tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgacct	3000
tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata	3060
gctcagctg taggtatctc agttcgggtg aggtcggtcg ctccaagctg ggctgtgtgc	3120
acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ctttatccgg taactatcgt cttgagtcca	3180
acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag	3240
cgaggatatg aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggt gcctaactac ggctacacta	3300
gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg	3360
gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc	3420
agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt	3480
ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggtattt ggtcatgaga ttatcaaaaa	3540
ggatcttcac ctatagctct ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat	3600
atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga	3660
tctgtctatt tcgttcattc atagtgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac	3720
gggagggctt accatctggc cccagtgcgt caatgatacc gcgagacca cgctcaccgg	3780
ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg	3840
caactttatc gcctccatc cagtctatta attggtgccc ggaagctaga gtaagtagtt	3900
cgccagttaa tagtttgccg aacgttggtt ccattgctac aggcattcgt gtgtcacgct	3960
cgtcgtttgg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat	4020
cccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtc tccgatcgtt gtcagaagta	4080
agttggccgc agtggttatca ctcatgggta tggcagcact gcataattct cttactgtca	4140
tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat	4200
agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac	4260
atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa	4320
ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac tcgtgcaccc aactgatctt	4380
cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg	4440
caaaaaaggg aataagggag acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat	4500
attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt	4560
agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca ctttccccg aaaagtgcga c	4611

REIVINDICACIONES

1. Cepa modificada de una especie perteneciente al reino Chromalveolata, en la que se modificó la actividad de la proteína CGI-58 para permitir la acumulación de aceite en la cepa, ventajosamente una acumulación de triacilglicerol, en el que la cepa es una cepa genéticamente modificada en la que la expresión del gen CGI-58 se silencia o atenúa.
2. Cepa modificada o genéticamente modificada según la reivindicación 1, que es una cepa de diatomeas.
3. Cepa modificada o modificada genéticamente según la reivindicación 2, en la que la diatomea es una diatomea pennada.
4. Cepa modificada o genéticamente modificada según cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 3, en la que la diatomea es del género *Phaeodactylum*.
5. Cepa modificada o genéticamente modificada según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la diatomea es *Phaeodactylum tricornutum*.
6. Cepa modificada o modificada genéticamente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que acumula o contiene al menos 1,5 veces el contenido de triacilglicerol de la cepa de tipo silvestre correspondiente.
7. Organismo o cepa modificado o modificado genéticamente de acuerdo con la reivindicación 6, que acumula o contiene al menos 4 veces el contenido de triacilglicerol de la cepa de tipo silvestre correspondiente.
8. Método de preparación de una cepa genéticamente modificada del reino Chromalveolata como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende la transformación de dicha cepa del reino Chromalveolata con un vector que expresa la construcción de ARNi diseñada para dirigir la expresión del gen de CGI-58.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el vector se introduce en la cepa mediante bombardeo de partículas o electroporación.
10. Método para aumentar la acumulación de triacilglicerol en una cepa perteneciente al reino Chromalveolata, que comprende la etapa de atenuar o silenciar la expresión del gen de CGI-58 en dicho organismo.
11. Método según la reivindicación 10, en el que la cepa se cultiva en un medio enriquecido en nitrógeno.
12. Método según la reivindicación 10, en el que la cepa se cultiva en un medio empobrecido en nitrógeno.
13. Uso de una cepa modificada o genéticamente modificada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la producción de triacilglicerol(es).
14. Método para la producción de triacilglicerol(es) que comprende las etapas de cultivar una cepa modificada genéticamente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un medio de cultivo, recoger los organismos genéticamente modificados y recuperar el(los) triacilglicerol(es).

A.



B.

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTA
ACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT
GTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAA
AACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGA
GGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTAGAGCTTGACGGGGAAA
GCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGG
CAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGG
GCGCGTCCCATTGCGCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
CGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAG
GGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATA
GGGCGAATTGGAGCTCGCAATCTCACGCACCAGGCGCTGGAAGGGCAACTTGCGGATGAGAAG
GTCCGTGGACTTCTGGTAACGACGGATCTCACGCAGAGCGACGGTTCAGGGCGATAACGGTG
GGGCTTCTTGACTCCTCCGGTAGCCGGAGCGGACTTGCGGGCAGCCTTGGTGGCAAGCTGCTT
GCGCGGCGCTTTGCCCTCCGGTGGATTTACGGGCGGTTTGCTTGGTTCGGGCCATTTTGACGGTT
TTTTTTACAAGAGAAGAGTTCTTGAAATTTGTGAGGTTAAAGTGTGTGGCTTCCGCCGTAGTCAAG
GAGCGTGCGTTGCCGATCGCACCGGTACGTTCTGTAGAAATGAACACAGTGTGTTGAATTGAAA
GTATGGCGCAGGTATGGTGTGTGATAAGTAGCAGCCGCGCCGAGACAAACAACTTTGGTTTCTA
CGACAATCTCTGTAGACAAGTACTAGAAACCCGTTTGAACGAGCATAAATCTGCACCGGCAGGCC
ACCAGACATCGTTTCAACGTAATATTCTACGTAACCATTTTATCCCAGGAAACCTACGGCCTGTGA
ACCACCGAGACGGAGCACTCACAATTCGCTCTCGGCAACAACCGACAATCGTCTTACTCACAGTC
AATACCGAAAAACAAACAGCCATGGCCAAGTTGACCAAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCG
CGACGTGCGCGGAGCGGTGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGA
GGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCA
GGTGGTGCCGACAAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCG
AGTGGTCGGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCTCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCG
GCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACTTC
GTGGCCGAGGAGCAGGACTGACCGACGCCGACCAACACCGCCGGTCCGACGCGGCCCGACGG
GTCCgAGGCCTTCTAGATGGCCCCGACTTACTCACTTGATATACATAACTCGGGGTGCATCTTGA
TTCATTGACCGTTTAGCTTCTgCTGCTTGCTGGACCTGCAATCCACCATTGAAATCCATCCAATCTT
GAGCACCGTACAAAAAGCCTACCGAAGGAACCTTCAAATGGGGAATCCGATGCAAGGCTGGCTC
CTTTGCAAAAATACAGGCGTCAAGATACGATTAATGCAGTACTCTCCGGATGCGGGCAAGGTGA
CGGCGCTTCGATAGAGGTATTCCGATACCGCGACACGCTCCTTCTCATCATCAATCGCCGGTAAT
CGACGACGTACGTATTCTGAATCATCCGCTCGCTACGACTAGTGGGTAACATGCGCAGCACGT
CTCCGGGAGTTTGCCGCCCGAACAggTAGTTGAATGTTCCGTACATCAGACGACCCTGCAAGAAT
TCTgagCTACCTCGACTTTGGCTGGGACACTTTCAGTGAGGACAAGAAGCTTCAGAAGCGTGCTAT
CGAACTCAACCAGGGACGTGCGGCACAAATGGGCATCCTTGCTCTCATGGTGCACGAACAGTTG

GGAGTCTCTATCCTTCCTTAAAAATTTAATTTTCATTAGTTGCAGTCACTCCGCTTTGGTTTCACAG
 TCAGGAATAACACTAGCTCGTCTTCAggtaccCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGC
 GCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACA
 ACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA
 ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT
 CGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGA
 CTCGCTGCGCTCGGTCTGTTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACG
 GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCC
 AGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
 AAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTT
 TCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCC
 GCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGT
 GTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
 CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAG
 CCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTG
 GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCT
 TCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTT
 GTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG
 GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG
 GATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA
 CTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTT
 CATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGC
 CCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA
 GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATT
 AATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCAT
 TGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTTCCTAAC
 GATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCG
 ATCGTTGTCAGAAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT
 CTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA
 GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCAC
 ATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCT
 TACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTA
 CTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG
 GGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGT
 TATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGC
 ACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

FIGURA 1

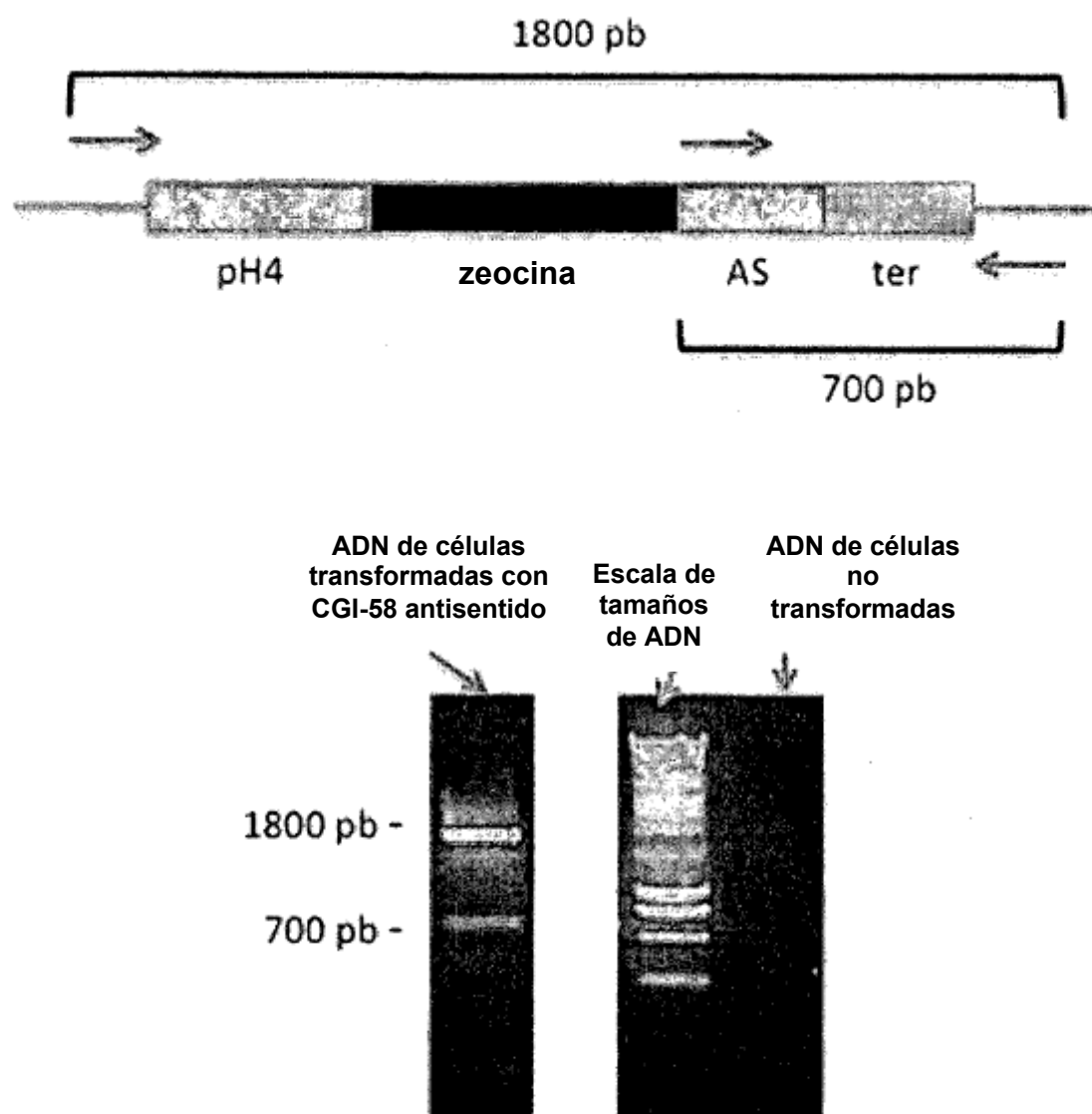


FIGURA 2

2 ejemplos de Pt que expresan CGI-58 antisentido (1_1 y 1_10) muestran un mayor contenido oleoso (Rojo Nilo) que el tipo silvestre (WT) en medio rico en nitrógeno y sin nitrógeno

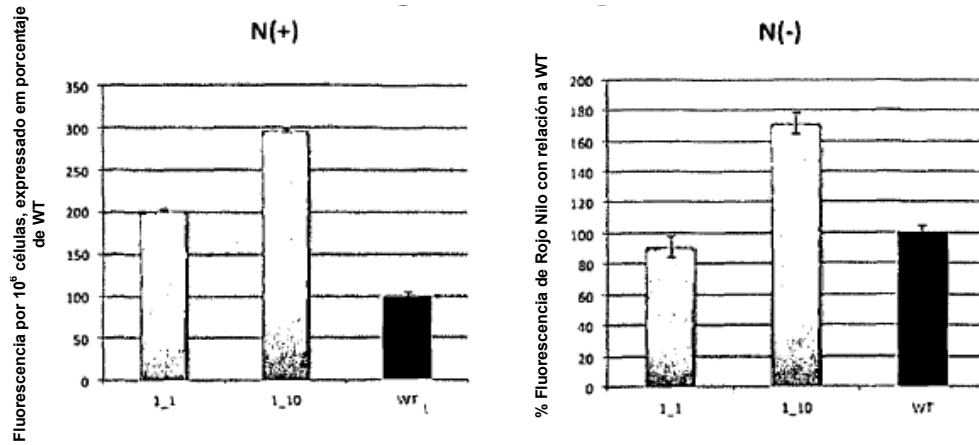


FIGURA 3

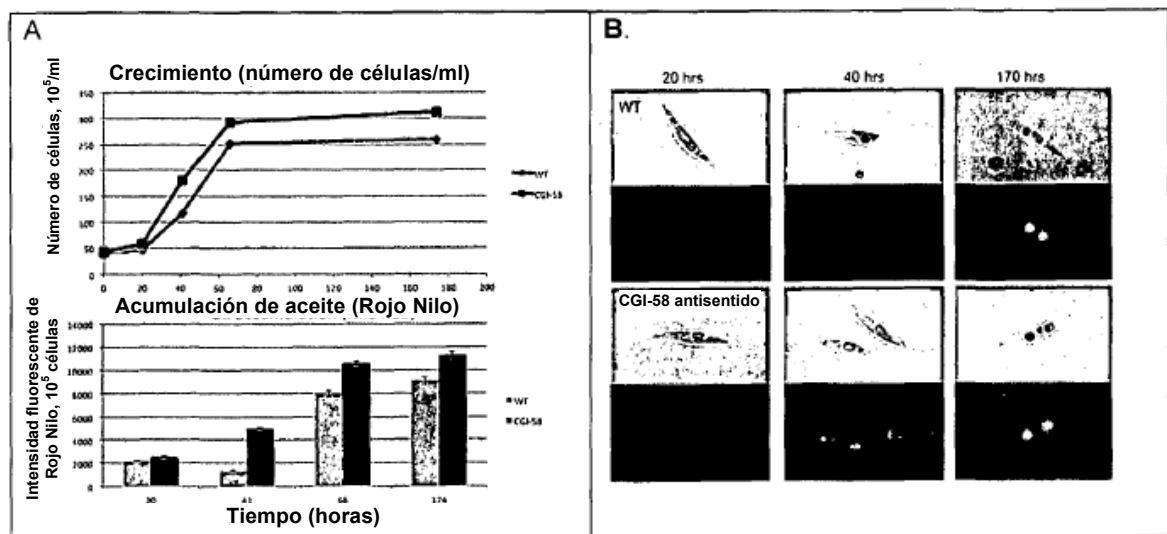


FIGURA 4